

القای نوروئی سلولهای بنیادی جنینی موش به دنبال هم کشتی با سومایتهای جنین جوجه

محسن سقا ^{M.Sc.}، ابراهیم اسفندیاری ^{Ph.D.}، شهنار رضوی ^{Ph.D.}، خدیجه کربلایی ^{M.Sc.}

محمد حسین نصر اصفهانی ^{Ph.D.}، حسین بهاروند ^{Ph.D.}

* گروه علوم تشریح دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

** بخش جنین شناسی پژوهشکده رویان

*** بخش جنین شناسی و سلولهای بنیادی پژوهشکده رویان

تاریخ وصول: اردیبهشت ماه ۸۶، تاریخ پذیرش: ماه ۸۶

چکیده

هدف: بررسی القای نوروئی سلولهای بنیادی جنینی موش به دنبال هم کشتی با سومایتهای جنین جوجه در محیط آزمایشگاهی مواد و روشها: این مطالعه به روش تجربی انجام شد. از سلولهای بنیادی جنینی لاین Royan B1، به روش قطره آویزان اجسام شبه جنینی (EB) تهیه شدند و برای بررسی پتانسیل تولید نوروئ از آنها مطابق با پروتکل $2+/-2$ به برخی از آنها اسید رتینوئیک اضافه شد. سومایتهای از جنین جوجه جدا شده و در محلول آلجنیت قرار داده شدند. در نهایت دانههای آلجنیت حاوی سومایت به نسبت ۱:۱ و ۱:۴ هم کشتی داده شدند.

یافته‌ها: میانگین تعداد EBهای حاوی نوروئ در گروههای RA، سومایت ۱:۴، سومایت ۱:۱ و کنترل به ترتیب برابر ۸۲/۸، ۳۵/۳، ۲۱/۱ و ۴/۸ درصد بود. نتایج به دست آمده نشان دادند سومایتهای جنین جوجه به دنبال هم کشتی با EB توانستند باعث القای نوروئی در آنها شوند و این تاثیر سومایتهای در گروه ۱:۴ نسبت به گروه ۱:۱ بیشتر بود. زمان ظهور نوروئ نیز در گروه RA و سومایتهای سریعتر از گروه کنترل بود. سومایتهای همچنین توانستند سبب ظهور ساختارهای رزتی در EBها شوند که با جداسازی و کشت مجدد، رزتها توانستند نوروئ تولید نمایند. در نهایت، ظهور فنوتیپ نوروئی و سلولهای پیش ساز آنها در گروههای سومایت و RA با روش ایمونوسیتوشیمی مورد تأیید قرار گرفت.

نتیجه گیری: سومایتهای جنین جوجه قادرند در محیط آزمایشگاهی باعث تولید نوروئ از EB شوند و می‌توانند تشکیل ساختارهای رزتی را در آنها القا نمایند.

کلید واژه‌ها: القای نوروئی، سلولهای بنیادی جنینی، هم کشتی، سومایتهای جنین جوجه

آدرس مکاتبه: تهران، پژوهشکده رویان، گروه جنین شناسی و سلولهای بنیادی، صندوق

پستی ۴۴۴-۱۹۳۹۵

Email: mh_nasr@med.mui.ac.ir

Email: Baharvand50@yahoo.com

مقدمه

سلولهای بنیادی جنینی^۱ سلولهای پرتوانی^۲ هستند که از جنین قبل از لانه گزینی به دست می‌آیند [۱ و ۲] این سلولها واجد دو ویژگی بسیار مهم هستند؛ اول اینکه توان نوسازی^۳ بسیار بالایی دارند و دوم اینکه سلولهای تمایز نیافته ای هستند که توانایی تمایز به لایه‌های زایای جنینی یعنی اکتودرم، مزودرم و آندودرم را دارند [۳].

سلولهای بنیادی جنینی با ایجاد ساختارهای سه بعدی و کروی شکلی بنام اجسام شبه جنینی^۴ در اغلب موارد مدل آزمایشگاهی مناسبی برای بررسی ابعاد مختلف مراحل اولیه تکامل جنینی پستانداران محسوب می‌شوند و ابزار توانمندی را فراهم می‌سازند که می‌توان با استفاده از آنها به مطالعه حوادث مختلف تکوین جنینی و فرآیندهای القا و تخصصی شدن^۵ سلولها و بافتهای مختلف بدن در مراحل اولیه تکوینشان پرداخت [۴]. پدیده نوروزن و ظهور سلولهای عصبی و مکانیسمهایی که در این پدیده دخالت دارند نمونه آشکاری از این فرآیند القاء و تخصصی شدن است؛ چرا که تولید و تخصص یافتگی سلول عصبی یک فرآیند چند مرحله ای است که اولین مرحله آن القای عصبی اکتودرم جنینی است [۵].

امروزه روشهای مختلفی وجود دارند که می‌توان با استفاده از آنها به تولید نورون از سلولهای بنیادی جنینی پرداخت. تیمار این سلولها با اسید رتینوئیک (RA) [۶]، روش انتخاب دودمان به واسطه فاکتورهای رشد^۶ [۷]، روش حذف سرم^۷ [۸] و نیز استفاده ترکیبی از برخی از فاکتورهای رشد مانند BMP2، Shh

و Wnt3a و نیز RA، FGF و Wnt از جمله روشهای تولید نورون از سلولهای بنیادی جنینی هستند [۹ و ۱۰]. یکی از مهمترین روش تولید نورون از این سلولها هم کشتی^۸ آنها با سلولها یا بافتهای خاصی مثل سلولهای استرومایی مشتق از ناحیه آئورت - گناد - مزونفروس جنینی [۱۱]، SDIA^۹ [۱۲] و [۱۳] و نیز محیط فراهم شده^{۱۰} از عقده ریشه پستی نخاع جنین جوجه [۱۴] و آستروسیت [۱۵] است.

سوماتهای جنینی توده‌هایی از سلولهای مزودرم پاراگزیکال هستند که در مجاورت لوله عصبی قرار دارند. آنها یکی از منابع تولید RA در بدن جنین هستند و فاکتورهای دیگری را نیز تولید و ترشح می‌کنند که تمایز نورونی را در نوروایپ تیوم لوله عصبی سبب می‌شوند، بنابراین باعث تولید نورون از سلولهای پیش ساز عصبی نوروایپتیوم می‌شوند [۱۶ و ۱۷]. سلولهای نوروایپتلیال صفحه عصبی در ابتدا ماهیت سری (مغز قدامی) دارند. تحت تاثیر عوامل ترشحي سومایت در جنین جوجه این سلولها ماهیت دمی (مغزهای میانی، خلفی و نخاع) پیدا می‌کنند. سوماتهای جنینی همچنین با رها ساختن رتینوئیدها و عوامل ترشحي دیگر هویت نورونهای حرکتی را در مناطق مختلف نخاع تعیین می‌کنند [۱۸]. از طرف دیگر در جنین دوزیستان آنها باعث فعال کردن القا کننده‌های عصبی نیز می‌شوند [۱۹] بنابراین با توجه به نقش القایی سومایت در تمایز عصبی در این مطالعه آثار القایی سوماتهای جنین جوجه را بر سلولهای بنیادی جنینی بررسی شد تا مشخص شود که آیا سوماتها می‌توانند علاوه بر تمایز عصبی در بدن جنین در محیط آزمایشگاهی نیز باعث القای نورونی سلولهای بنیادی جنینی شوند؟ بنابراین برای بررسی آثار القایی سومایت از هم کشتی آنها با اجسام شبه جنینی حاصل از سلولهای بنیادی جنینی استفاده شد.

1 . Embryonic stem cells (ES Cells)

2 . Pluripotential cells

3. Self-renewal

4 . Embryoid bodies (EBs)

5. Specification

6. Growth factor – mediated lineage selection

7. Serum - free medium

8 . Co-culture

9 . Stromal cell derived inducing activity

10. Conditioned medium

مواد و روشها

کشت سلولهای بنیادی جنینی

تعداد $10^5 \times 3$ سلول بنیادی جنینی موش دودمان Royan B1 در ۳۷ درجه سانتی گراد و ۶٪ CO₂ درصد روی فیبروبلاستهای جنینی موشی تیمار شده با مایتومایسین در محیط K-DMEM, ES-FCS 15%, ۱ میلی مولار اسید آمینه غیرضروری، ۰/۱ میلی مولار بتا -مرکاپتواتانل، ۱ درصدال - گلوتامین، ۱ درصد پنی سیلین و استرپتومایسین و ۱۰۰۰ U/ml عامل مهارکننده لوسمی (LIF) کشت داده شدند.

تهیه اجسام شبه جنینی (EB)

پس از جدا سازی سلولهای ES, از سلولهای فیبروبلاستی برای تهیه EB به روش قطره آویزان^۲ قطرات ۲۰ μL حاوی ۱۰۰۰ سلول در هر قطره در محیط K-DMEM, ES-FCS 10%, ۱ میلی مولار اسید آمینه غیرضروری، ۰/۱ میلی مولار بتا -مرکاپتواتانل، ۱ درصدال - گلوتامین، ۱ درصد پنی سیلین و استرپتومایسین بدون حضور LIF (محیط کشت سوسپانسیون) بر روی درب ظروف کشت باکتریایی به مدت دو روز کشت داده شدند (مرحله تشکیل EB).

جداسازی سومايت از جنين جوجه

تخم مرغهای نطفه دار از مرکز اصلاح نژاد مرغ بومی اصفهان تهیه شدند و در ۳۸ درجه سانتی گراد و رطوبت نسبی ۶۰ درصد نگهداری شدند تا جنینهای جوجه مطابق با جدول تکاملی هامبورگر - هامیلتون [۲۰] به مرحله ۵ - ۱۰ سومايتی برسند. سپس جنینها از سطح زرده جدا شده و در محیط Leibovitz's (L15) قرار داده شدند. برای تفکیک لایه‌های

اکتودرمی، مزودرمی و آندودرمی از هم و جداسازی راحت تر سومايتها، جنینها به مدت ۵ دقیقه در ۴ ml آنزیم Dispase با غلظت ۱ mg/ml قرار داده شدند و پس از خشتی شدن اثر آنزیم توسط L15: FCS, سومايتها در زیر استرئومیکروسکوپ به کمک سوزنهای انسولینی از جنینهای جوجه جدا شدند.

تهیه دانه‌های آلجینیت^۳ حاوی سومايت

چنانچه سومايتها در مجاورت EBها قرار بگیرند تمایل دارند به آنها متصل شوند. به همین دلیل برای جلوگیری از ادغام آنها، سومايتها در داخل محلول آلجینیت قرار داده شدند. برای انجام این عمل، مقدار ۱/۲ گرم پودر آلجینیت در ۱۰۰ میلی لیتر محلول ۰/۱۵ مولار NaCl حل شد تا محلول آلجینیت ۱/۲ درصد به دست آید. پس از دو بار شستشوی سومايتها در PBS فاقد کلسیم و منیزیم، قطرات ۱۵ - ۲۰ μL محلول آلجینیت حاوی سومايت (دانه‌های آلجینیت) به مدت ۱۰ دقیقه در محلول ۱۰۲ میلی مولار CaCl₂ قرار داده شدند. این دانه‌ها پس از ۲ بار شستشو در محلول ۰/۱۵ مولار NaCl به دو گروه تقسیم شدند؛ گروهی که نسبت سومايت به EB ۱:۱ بود (گروه سومايت ۱:۱) و گروهی که نسبت سومايت به EB ۱:۴ بود (گروه سومايت ۱:۴). در یک گروه نیز دانه‌های آلجینیت فاقد سومايت تهیه شد. در نهایت دانه‌های آلجینیت هر سه گروه برای هم کشتی با EB به ظروف حاوی محیط کشت سوسپانسیون انتقال داده شدند و به مدت ۴ روز در مجاورت با EBها در شرایط ۳۷ درجه سانتی گراد و ۶٪ CO₂ درصد نگهداری شدند (مرحله سوسپانسیون).

گسترش و تمایز EB

پس از ۴ روز هم کشتی EBها با سومايتها و دانه‌های آلجینیت

1- Leukemia Inhibitory factor

2 - Hanging drop method

3- Alginate beads

mouse anti-Map-2 monoclonal antibody (Sigma M1406) و mouse anti-Nestin monoclonal antibody (Chemicon MAB353) انکوبه شدند. پس از سه بار شستشو با PBS/Tween20، EBها به مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد در معرض secondary fluorescein-conjugated anti-goat IgG (FITC) (Chemicon AP124F) قرار گرفتند. پس از سه بار شستشو با PBS/Tween20 هسته سلولها با PI رنگ شد و مجدداً "بعد از سه بار شستشو با PBS/Tween20 به کمک میکروسکوپ فلوروسنس Olympus مدل BX51 و با نرم افزار Olysia عکسهای لازم گرفته شد.

جداسازی و کشت مجدد رزتها

پس از ظهور رزتها در EB، این ساختارها به کمک سوزن انسولینی و پیپت پاستور از EBها جدا شده و در محیط کشت تمایزی مجدداً "کشت داده شدند. از روش هضم آنزیمی نیز برای کشت مجدد رزتها استفاده شد. در این روش ابتدا به EBهای حاوی رزت آنزیم تریپسین به مدت ۳ دقیقه اضافه شد و پس از شستشو با PBS، سوسپانسیون سلولی مجدداً "در محیط کشت تمایزی کشت داده شدند.

تجزیه و تحلیل آماری

نتایج به دست آمده در این مطالعه تجربی، پس از تعیین SEM \pm Mean داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۱/۵ و به کمک آزمون Tukey One-way ANOVA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها

القای نورونی اجسام شبه جنینی

برای بررسی القای نورونی EBها، آن دسته از EBهایی که بیش از ۱۰ درصد نورون تولید کردند به عنوان EBهای حاوی نورون در نظر گرفته شدند. این مطالعه نشان داد که تعداد $2/3 \pm 4/8$ درصد از EBهای گروه کنترل به نورون تمایز یافتند

فاقد سومایت، EBها به ظروف کشت ۲۴ خانه ای پوشش داده شده با ۰/۱ درصد ژلاتین که حاوی $350 \mu L$ محیط کشت 5% K-DMEM ES-FCS، ۱ میلی مولار اسید آمینه غیرضروری، ۰/۱ میلی مولار بتا - مرکاپتواتانل، ادرصدال - گلوتامین، ادرصدپنی سیلین و استرپتومایسین (محیط کشت تمایزی) در هر خانه بود منتقل شدند تا پس از گسترش تمایز یابند. در گروه کنترل نیز تعدادی از EBها که تحت هم - کشتی با سومایت و دانه‌های آلفجینیت قرار نگرفته بودند پس از ۴ روز سوسپانسیون به این ظروف انتقال داده شدند.

چون اسید رتینوئیک (RA) در غلظتهای بالا ($10^{-6} M$) نقش موثری در القای نورونی سلولهای بنیادی جنینی دارد [۶ و ۲۱] بنابراین برای بررسی پتانسیل القای نورونی EBها این گروه به عنوان گروه کنترل مثبت در نظر گرفته شد. در این گروه تعدادی از EBها در مرحله سوسپانسیون به مدت ۴ روز مطابق با پروتکل $2+/2-21$ تحت تاثیر یک میکرومول ($10^{-6} M$) all-trans RA قرار گرفتند. بر طبق این پروتکل به مدت دو روز و بدون حضور RA، EBها تشکیل شدند ($2-$)، سپس به مدت ۲ روز به آنها RA اضافه شد ($2+$) و پس از تعویض محیط کشت مجدداً EBها به مدت ۲ روز دیگر تحت تاثیر RA قرار گرفتند ($2+$). در نهایت القای نورونی EB کلیه گروهها ارزیابی شد.

ایمونوسیتوشیمی

EBها پس از دو بار شستشو با محیط فاقد سرم به مدت ۳۰ دقیقه در پارافرمالدید ۴ درصد در ۴ درجه سانتی گراد تثبیت شدند. پس از سه بار شستشو با PBS/Tween20 به مدت ۲۵ دقیقه بر آنها Triton X-100 تاثیر داده شد. EBها در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱ ساعت با 10% normal goat serum بلوک شده و به صورت overnight در ۴ درجه سانتی گراد با آنتی - بادیهی - ای اولیه - بر ضد mouse anti- β -tubulin III monoclonal antibody (Sigma T8660)

گسترش EBها بود در حالی که این تمایز در دو گروه سومیت ۱:۱ و ۱:۴ حدود ۸ روز بعد از گسترش EBها مشاهده شد. اگرچه نورونها در گروههای سومیت زودتر از گروه کنترل مشاهده شدند ولی اختلاف معنی داری بین آنها در زمان ظهور نورون مشاهده نشد. فنوتیپ نورونی در گروه RA سریعتر از سایر گروهها ظاهر شد ($0.01 < P$) (3 ± 0.54 روز) (نمودار ۲).

تشخیص بیان آنتی ژنهای سلولهای پیش ساز عصبی و نورونها

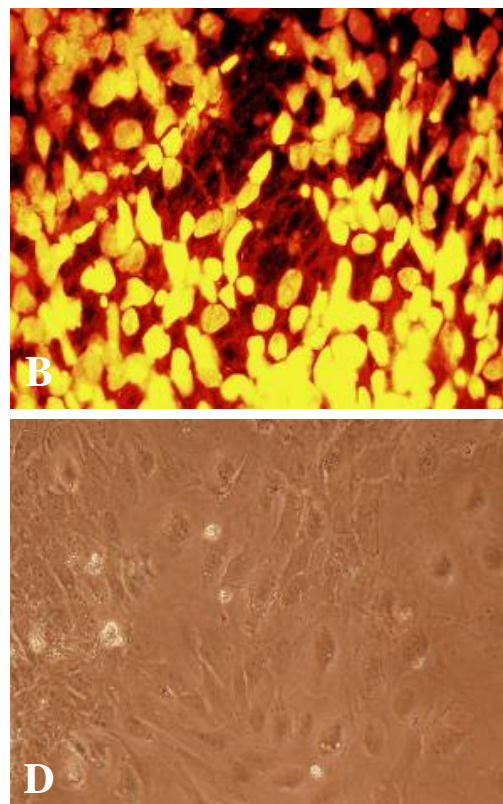
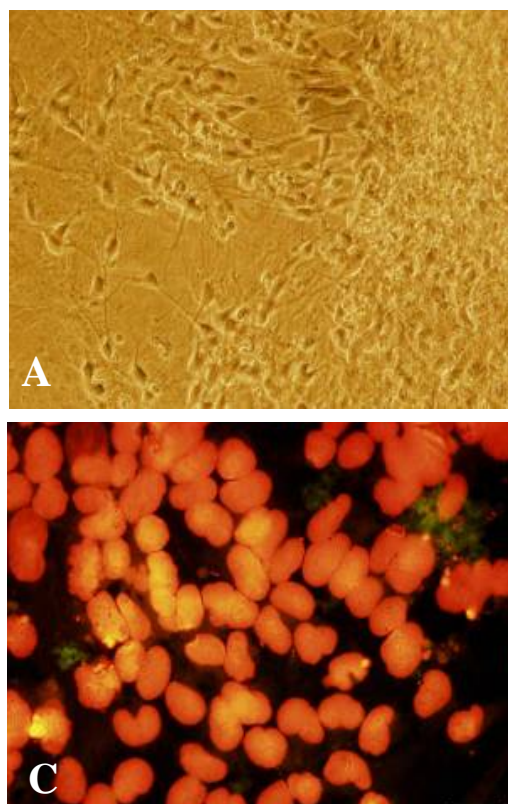
برای بررسی تمایز سلولهای بنیادی جنینی به سلولهای پیش ساز عصبی، بیان آنتی ژن خاص این سلولها یعنی نستین که نوعی رشته حدواسط عصبی است ارزیابی شد. مطالعات نشان دادند این آنتی ژن در گروه سومیت ۱:۴ و ۱:۱ بیان خوبی داشت ولی بیان آنها در گروه کنترل بسیار کم بود (شکل ۱).

در حالی که این میزان در گروه آلجینیت کمتر ($1/8 \pm 1/8$ درصد) بود ($P > 0.05$) (نمودار ۱). میانگین تعداد EBهای تمایز یافته به نورون در گروه سومیت ۱:۱ ($6/03 \pm 21/05$ درصد) بیشتر از گروههای کنترل و آلجینیت بود ($P < 0.05$). از طرف دیگر به دنبال افزایش نسبت سومیت به EB در گروه سومیت ۱:۴، تعداد بیشتری از EBها به نورون تمایز یافتند

($35/3 \pm 5/6$ درصد) (نمودار ۱). با این حال، بیشترین درصد EBهای تمایز یافته به نورون، در گروه RA ($82/8 \pm 3/7$ درصد) مشاهده شدند ($P < 0.001$) (نمودار ۱).

زمان تمایز به نورون

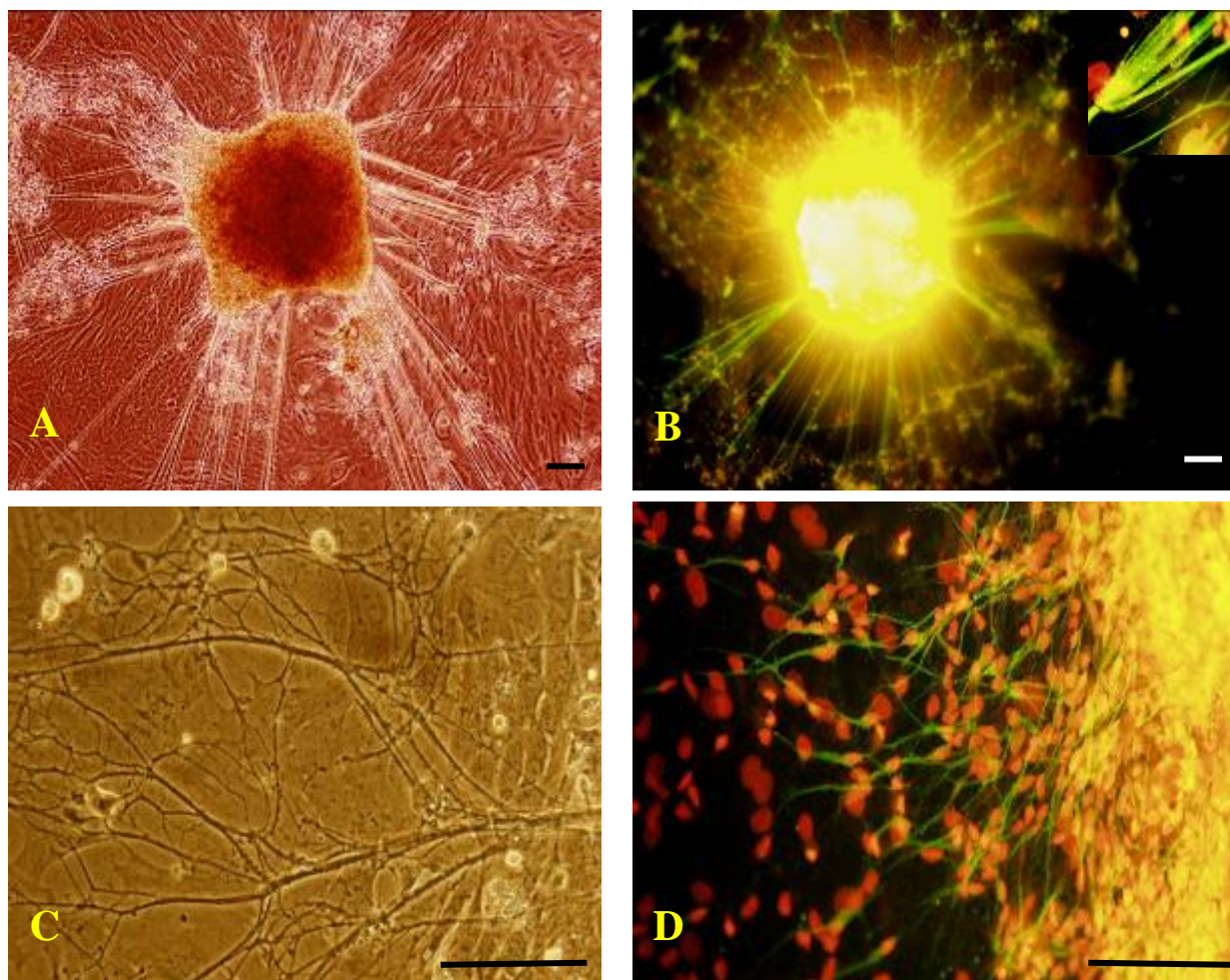
زمان تمایز به نورون در گروههای مختلف به دنبال ظهور اولین فنوتیپ نورونی در EBها ثبت شد. تمایز سلولهای بنیادی جنینی به نورون در گروه کنترل بعد از ۱۰ روز



شکل ۱. بیان نشانگر نستین در گروههای سومیت و کنترل (A) تصویر میکروسکوپ فاز کنتراست از سلولهای پیش ساز عصبی در گروه سومیت (B) بیان نستین در سلولهای پیش ساز عصبی گروه سومیت (C) تصویر میکروسکوپ فاز کنتراست از سلولهای بنیادی جنینی در گروه کنترل و (D) بیان بسیار کم نستین در سلولهای گروه کنترل، بار: ۵ میکرو متر

سومایت بیشتر از گروه کنترل بود ولی بیشترین بیان آنها در گروه RA مشاهده شد (شکل ۲).

برای بررسی بیان آنتی ژنهای نورونی نیز از آنتی بادیهای ضد MAP-2 و بتا - توبولین III در گروههای کنترل، سومایت و RA استفاده شد (شکل ۲). بیان این آنتی ژنها در گروه



شکل ۲. نورونهای حاصل از گروههای سومایت و RA ، (A) تصویر فاز کنتراست از نورونهای حاصل از سلولهای بنیادی جنینی در گروه RA (B) بیان نشانگر بتا - توبولین III در گروه RA. کادر کوچک بالا و سمت راست تصویر زوائد نورونی در این گروه است، (C) تصویر فاز کنتراست از نورونهای حاصل از سلولهای بنیادی جنینی در گروه سومایت و (D) بیان نشانگر Map-2 در آن، بار: ۱۰۰ میکرومتر

اجسام شبه جنینی در هر دو گروه سومایت بود. این ساختارها شبیه لوله عصبی بودند که در وسط جدار اپیتلیالی این ساختارهای لوله ای یک حفره مرکزی به چشم می خورد. این ساختارها در گروههای کنترل و RA مشاهده نشدند (شکل ۳).

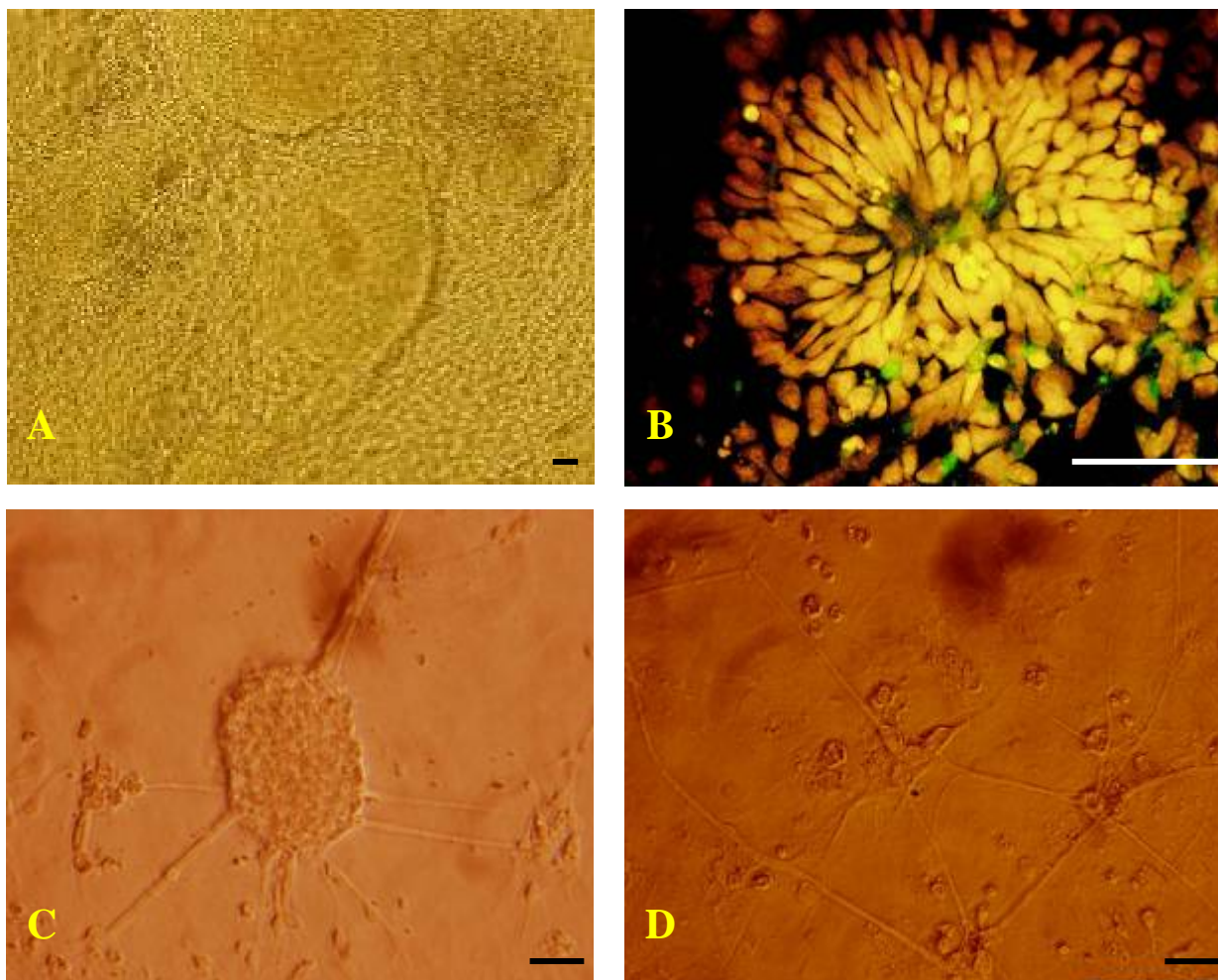
ظهور ساختارهای شبیه به لوله عصبی^۱

نتایج حاصل از این مطالعه بیانگر ظهور ساختارهای رزتی در

1- Rosette structure

با جدا سازی رزتها به صورت مکانیکی و آنزیمی از EBهای گروه سومایت و پس از ۲-۳ روز کشت مجدد در محیط کشت تمایزی، رزتها به نورون تمایز پیدا کردند (شکل D ۳).

برای مقایسه، توده‌های سلولی وسط EBهای گروه کنترل نیز جدا و کشت داده شد و هیچ گونه نورونی از آنها به دست نیامد.



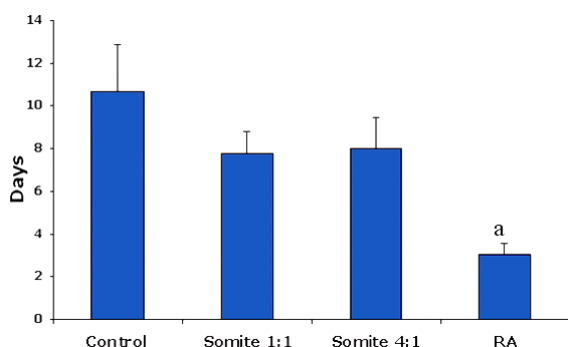
شکل ۳. رزتهای حاصل از اجسام شبه جنینی در گروه سومایت و تمایز نورونی در آنها، (A) تصویر میکروسکوپ فازکتر است از ساختارهای رزتی در گروه سومایت. (B) تصویر میکروسکوپ فلوروسانس از رزتها پس از رنگ آمیزی ایمونوسیتوشیمی با آنتی بادی ضد MAP-2، (C) جداسازی رزتها از اجسام شبه جنینی و کشت مجدد آنها در محیط کشت تمایزی و (D) ظهور نورون به دنبال کشت مجدد رزتها، بار: ۴۰ میکرومتر

بحث

سلولهای بنیادی جنینی چنانچه مستقیماً به محل ضایعه عصبی تزریق شوند، ممکن است باعث ایجاد تراتوکارسینوما شوند و چنانچه در محیط آزمایشگاهی خود به خود تمایز یابند تعداد بسیار کمی از آنها به نورون تبدیل می‌شوند؛ به همین دلیل

سعی می‌شود به کمک عوامل القاگر عصبی ابتدا این سلولها به سلولهای پیش ساز عصبی یا نورون تبدیل شده و سپس به محل ضایعه تزریق شوند [۵]. با این حال ترکیب دقیق عوامل رشدی که باعث ظهور فنوتیپ تمایزی خاصی از جمله نورون از سلولهای بنیادی جنینی می‌شود به طور دقیق شناخته نشده

کیتازاوا (Kitazawa) و همکارش در سال ۲۰۰۵ با استفاده از تاثیر محیط فراهم شده از عقده‌های ریشه پستی نخاع (DRG) جنین ۸ روزه جوجه بر کلونی‌های حاصل از سلولهای بنیادی جنینی توانستند سبب القای نورونی در این کلونیاها شوند [۱۴]. سوگی (Sugie) و همکارانش نیز به دنبال هم کشتی شبکه چشم جنین جوجه با سلولهای بنیادی جنینی توانستند سبب تولید فتورسپتورها از این سلولها شوند [۲۲]. این مطالعات همگی این نکته را بیان می‌کنند که ترشحات قابل انتشار حاصل از بافتهای جنین جوجه می‌تواند با تغییر محیط اطراف سلولهای بنیادی جنینی باعث ظهور فنوتیپ نورونی در این سلولها شوند.

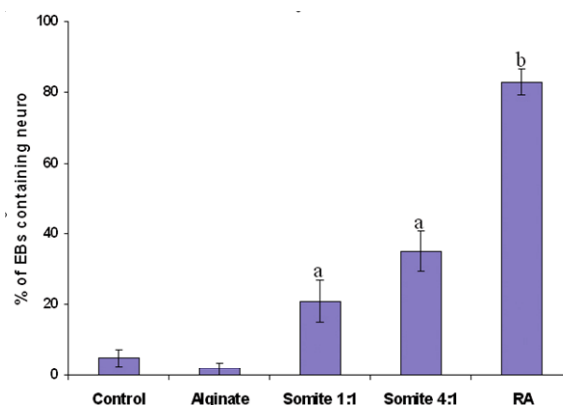


نمودار ۲. مقایسه میانگین زمان ظهور نورون از اجسام شبه جنینی در گروههای مختلف

کنترل: گروه بدون هم کشتی و تیمار، سومات ۱:۱: گروهی که نسبت تعداد سومات به تعداد EB به صورت ۱:۱ بود، سومات ۱:۴: گروهی که نسبت تعداد سومات به تعداد EB به صورت ۱:۴ بود و RA: گروه تحت تیمار با اسید رتینوئیک، a، اختلاف معنی دار با سایر گروهها ($p < 0.01$) ($n = 4-5$)

از طرف دیگر سوماتهای جنینی با رهایی اسید رتینوئیک و فاکتورهای دیگر باعث تولید نورون از سلولهای پیش ساز عصبی نوروپیتلیوم می‌شوند [۱۶ و ۱۷]. بررسیهای صورت گرفته نشان می‌دهند که در جنین دوزیستان سوماتها قدرت القای عصبی را دارند [۱۹]. بنابراین در این مطالعه پتانسیل

است [۱۱]؛ به همین دلیل سعی می‌شود با استفاده از محیط فراهم شده یا هم کشتی مستقیم بافتها و سلولهای مختلف از جمله آستروسیتها [۱۵] و سلولهای استرومایی [۱۲ و ۱۳] با سلولهای بنیادی باعث تولید نورون از آنها شوند.



نمودار ۱. مقایسه میانگین درصد EBهای حاوی نورون در گروههای مختلف.

کنترل: گروه بدون هم کشتی و تیمار، سومات ۱:۱: گروهی که نسبت تعداد سومات به تعداد EB به صورت ۱:۱ بود، سومات ۱:۴: گروهی که نسبت تعداد سومات به تعداد EB به صورت ۱:۴ بود و RA: گروه تحت تیمار با اسید رتینوئیک، a، اختلاف معنی دار با گروه کنترل و آلجینیت ($p < 0.05$) و b، اختلاف معنی دار با گروههای سومات، کنترل و آلجینیت ($P < 0.001$) ($n = 4-6$)

سیستمهای هم کشتی روش مناسبی برای ایجاد تعامل بین بافتهای متفاوت هستند و در این میان بافتهای جنین جوجه برای ارزیابی پتانسیل تکاملی بافتهای جنینی موش ابزار مناسبی به نظر می‌رسند [۲۲]. فونتانی پروس (Fontanie-perus) و همکارانش با استفاده از هم کشتی بافتهای جنینهای جوجه و موش مدل تجربی مناسبی برای بررسی نحوه تکوین سوماتها ارائه کردند [۲۳ و ۲۴]. همچنین پلاتا (Plachta) و همکارانش دریافتند که سلولهای بنیادی جنینی به دنبال هم کشتی با بافتهای جنین جوجه می‌تواند به نورون تمایز یابند [۲۵].

القای نورونی سوماتیهای جنین جوجه به دنبال هم کشتی با سلولهای بنیادی جنینی بررسی شد تا مشخص شود که آیا سوماتیها علاوه بر تمایز نورونی سلولهای پیش ساز عصبی در محیط بدن آیا می توانند باعث القای تولید نورون از سلولهای بنیادی جنینی در محیط آزمایشگاهی شوند. از آنجایی که سوماتیها تمایل زیادی برای اتصال به EB در محیط کشت دارند بنابراین برای جلوگیری از این ادغام، سوماتیها در داخل محلول آلجینیت قرار داده شدند. نتایج به دست آمده بیانگر القای نورونی سلولهای بنیادی جنینی تحت تاثیر سوماتیت است (نمودار ۱). این یافته ها با نتایج حاصل از تاثیر محیط فراهم شده از سوماتیت، مغز خلفی^۱ و کیست شنوایی^۲ بر سلولهای بنیادی مغز استخوان موش نیز مطابقت دارد [۲۶]. در مطالعه مذکور سلولهای بنیادی مغز استخوان توانستند تحت تاثیر ترشحات حاصل از بافتهای جنینی فوق الذکر فنوتیپ نورونی را از خود نشان دهند، اگرچه تاثیر سوماتیت به تنهایی نشان داده نشد. در حالی که در مطالعه حاضر تاثیر سوماتیت به تنهایی مورد بررسی قرار گرفت. از طرف دیگر در مطالعه سوگی (Sugie) بافتهای شبکیه چشم جنین جوجه پس از القای نورونی EBها به کمک RA و روش انتخاب دودمان و به دست آوردن سلولهای پیش ساز عصبی با این سلولها هم کشتی داده شدند [۲۲] در صورتی که در مطالعه حاضر هیچ گونه القای نورونی قبل از هم کشتی سوماتیت با EB صورت نگرفت و تنها تاثیر ترشحات سوماتیت بود که توانست سبب تولید نورون از EBها شود.

از آنجا که سوماتیها برای تولید دانه های آلجینیت حاوی سوماتیت در داخل محلول آلجینیت قرار داده شدند، به منظور بررسی تاثیر این دانه ها بر فرآیند نوروزن یک گروه از EBها تحت تاثیر این دانه ها قرار داده شدند و نتایج به دست آمده

نشان دادند که این دانه هیچ گونه تاثیری در فرآیند تولید نورون از سلولهای بنیادی در محیط آزمایشگاهی نداشتند و تاثیر سوماتیت ناشی از حضور خود سوماتیت بود نه دانه های آلجینیت.

بررسیهای صورت گرفته نشان می دهد که RA در غلظتهای بالا می تواند سبب القای نورونی در سلولهای بنیادی جنینی شود [۲۱]. در مطالعه حاضر نیز گروه RA به عنوان گروه کنترل مثبت برای ارزیابی پتانسیل القای نورونی سلولهای بنیادی جنینی در نظر گرفته شد و نتایج به دست آمده نشان داد که درصد فراوانی از EBها ($3/7 \pm 8/8$ درصد) توانستند به نورون تمایز یابند. دلیل این امر آن است که RA در غلظت بالا (10^{-6} مولار) به عنوان یک فاکتور مورفوزنیک تاثیر مستقیمی بر EBها داشت و توانست تمایز عصبی را در آنها القا نماید در صورتی که در گروه سوماتیت، EBها از ترشحات حاصل از هم کشتی با سوماتیت برای تمایز به نورون بهره گرفتند و از آنجایی که ترشحات حاصل از سوماتیت (مانند رتینوئیدها) بسیار کم و در حد نانومولار است [۲۷]؛ بنابراین در گروه سوماتیت ۱:۱ درصد کمتری از EBها به نورون تمایز یافتند ($6/3 \pm 21/05$ درصد) ($P < 0.001$). بنابراین از تعداد بیشتری سوماتیت برای القای نورونی EBها استفاده شد. نتایج به دست آمده نشان داد که با افزایش نسبت سوماتیت به EB از ۱:۱ به ۱:۴، تاثیر القایی سوماتیها بر میانگین درصد EBهای حاوی نورون افزایش یافته و تعداد بیشتری از EBها به نورون تمایز پیدا کردند ($5/6 \pm 3/35$ درصد) (نمودار ۱) ولی باز هم نسبت به گروه RA درصد کمتری از EBها به نورون تمایز یافتند ($P < 0.001$).

مقایسه زمان تمایز سلولهای بنیادی جنینی به نورون نیز نشان داد که در گروه کنترل از روز دهم به بعد فنوتیپ نورونی ظاهر شدند و این نتیجه با مطالعه راجن (Rathjen) و لاک (Lake) [۲۸ و ۲۹] همخوانی داشت. در گروه سوماتیت، زمان ظهور نورون در دو گروه سوماتیت ۱:۴ و ۱:۱ فرق

1. Hindbrain
2. Ototyst

چندانی نداشت، اما سریعتر از این زمان در گروه کنترل بود (هشت روز پس از گسترش EBها). با این حال هیچ تفاوت معنی داری بین زمان ظهور نورون در گروههای سومایت با گروه کنترل مشاهده نشد (نمودار ۲). در گروه RA سلولهای بنیادی جنینی سریعتر از سایر گروهها و ظرف مدت ۳ روز توانستند به نورون تمایز یابند ($P < 0.01$) که این نتیجه مشابه با نتایج حاصل از مطالعه با ین (Bain) و همکارانش بود [۶]. یکی از ویژگیهای EBهایی که با سومایتها هم کشتی داده شدند ظهور ساختارهای رزت مانند در EBها بود. این ساختارها معمولاً "در سلولهای بنیادی جنینی انسانی دیده می شوند و به عنوان اولین نشانه تمایز عصبی در نظر گرفته می شوند. سلولهای موجود در رزت شبیه سلولهای منشوری هستند [۳۰]. همین ساختارها در EBهای گروههای سومایت مشاهده شدند و توانستند پس از جدا شدن از EB و کشت مجدد، به نورون تمایز یابند. لی و همکارانش ظهور رزتهای سلولهای بنیادی جنینی انسانی را طی ۸ تا ۱۰ روز بعد از گسترش گزارش کردند که طی ۴-۵ روز بعد سلولهای منشوری رزتی حول یک حفره مرکزی تجمع می یابند [۳۰]. در مطالعه حاضر نیز رزتها از روز هفتم گسترش به بعد در

EBهای گروه سومایت ظاهر شدند و تا روز دهم سلولهای منشوری حول یک حفره مرکزی تجمع یافته بودند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان می دهد اگرچه نسبت به گروه RA تعداد کمتری از EBها به دنبال هم کشتی با سومایت به نورون تمایز یافتند، اما مشخص شد در محیط آزمایشگاهی سومایتها جنین جوجه پتانسیل القای نورونی را دارند و قادرند به عنوان یک کانون سیگنال دهنده عصبی باعث تولید نورون از سلولهای بنیادی جنینی موش شوند. از طرف دیگر، سومایتها می توانند سبب ظهور ساختارهای رزتی در سلولهای بنیادی جنینی موش همانند آنچه که در سلولهای بنیادی جنینی انسانی دیده می شود گردند. اینکه سومایتها با چه مکانیزمی سبب بروز چنین تغییراتی در سلولهای بنیادی جنینی می شوند موضوعی است که امیدواریم در آینده به آن اشاره شود.

تقدیر و تشکر

این مطالعه با استفاده از منابع مالی پژوهشکده رویان انجام شده است و نویسندگان مقاله بدین وسیله مراتب تقدیر و تشکر خود را از پژوهشکده رویان به عمل می آورند.

References

1. **Evans MJ, Kaufman M.** Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292: 154-6.
2. **Martin GR.** Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 7634-8.
3. **Sato M, Nakano T.** Embryonic Stem Cell. *Int Med* 2001; 40 (3):195-200.
4. **Desbaillets I, Ziegler U, Groscurth P, Gassmann M.** Embryoid bodies: an in vitro model of mouse embryogenesis. *Exp Physiol* 2000; 85(6): 645-51.
5. **Wei Du Z, Zhang SC.** Neural Differentiation from Embryonic Stem Cells: Which Way? *Stem Cells Dev* 2004; 13: 372-81.
6. **Bain, G, Kitchens D, Yao M, Huettner JE, Gottlieb DI.** Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Dev Biol* 1995; 168: 342-57.
7. **Guan K, Chang H, Rolletschek A, Wobus AM.** Embryonic stem cell-derived neurogenesis: Retinoic acid induction and lineage selection of neuronal cells, *Cell Tissue Res* 2001; 305: 171-6.
8. **Tropepe V, Hitoshi S, Sirard C, Mak TW, Rossant J, Van der Kooy D.** Direct neural fate

- specification from embryonic stem cells: a primitive mammalian neural stem cell stage acquired through a default mechanism. *Neuron* 2001; 30: 65–78.
9. **Irioka T, Watanabe K, Mizusawa H, Mizuseki K, Sasai Y.** Distinct effects of caudalizing factors on regional specification of embryonic stem cell – derived neural precursors. *Dev Brain Res* 2005; 154: 63-70.
 10. **Murashov AK, Pak ES, Hendricks WA, wensby JP, Sierpinski PL, Tatko LM, et al.** Directed differentiation of embryonic stem cells into dorsal Interneurons, *The FASEB J* 2005; 19(2): 252-4
 11. **O'Shea K. S.,** Self-renewal vs. Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells, *Biol. Rep.*, 2004, 71:1755–1765.
 12. **Kawasaki H, Mizuseki K, Nishikawa S, Kaneko S, Kuwana Y, Nakanishi S, Nishikawa SI, Sasai Y** Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron*, . 2000, 28:31–40.
 13. **Kawasaki H, Suemori H, Mizuseki K, Watanabe K, Urano F, Ichinose H, Haruta M, Takahashi M, Yoshikawa K, Nishikawa S, Nakatsuji N, Sasai Y.,** Generation of dopaminergic neurons and pigmented epithelia from primate ES cells by stromal cell-derived inducing activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99:1580-1585.
 14. **Kitazawa A., Shimizu N.,** Differentiation of mouse embryonic stem cells into neurons using conditioned medium of dorsal root ganglia, *J. Biosci. Bioeng.*, 2005, 100(1):94-99.
 15. **Nakayama T., Momoki-Soga T., Inoue N.,** Astrocyte-derived factors instruct differentiation of embryonic stem cells into neurons, *Neurosci. Res.*, 2003, 46:241-249.
 16. **Corral R. D. D. , Martinez I.O., Goreilly A., Gale E., Maden M., Storey K.** Opposing FGF and retinoid pathways control ventral neural pattern and neuronal differentiation, and segmentation during body axis extension, *Neuron*, 2003, 40:65-79
 17. **Corral R. D. D., Storey K. G.,** Opposing FGF and retinoid pathways: a signaling switch that controls differentiation and patterning onset in the extending vertebrate body axis, *BioEssays*, 2004, 26:857–869.
 18. **Liu J. P. , Laufer E. and Jessell T. M. ,** Assigning the positional identity of spinal cord motor neurons: rostrocaudal patterning of Hox-c expression by FGFs , Gdf11 and retinoids, *Neuron* 2001, 32:997-1012.
 19. **Harland R.,** Neural induction, *Curr. Opin. Gen. & Dev.*, 2000, 10:357—362
 20. **Hamburger V., Hamilton HL.,** A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.*, 1951, 88:49-92.
 21. **Okada Y. , Shimazaki T. , Sobue G. , Okano H.,** Retinoic-acid-concentration-dependent acquisition of neural cell identity during in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells, *Dev. Biol.* , 2004, 275 , 124– 142.
 22. **Sugie Y., Yoshikawa M., Oujii Y., Saito K., Moriya K., shizaka S., Matsuura T., Maruoka S., Nawa Y., Hara Y.,** Photoreceptor cells from mouse ES cells by co-culture with chick embryonic retina, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2005, 332:241–247.
 23. **Fontaine-Perus J., Jarno V., Fournier le Ray C., Li Z., Paulin D.,** Mouse chick chimera: a new model to study the in ovo developmental potentialities of mammalian somites, *Dev.* 1995, 121:1705–1718.
 24. **Fontaine-Perus J.,** Mouse-chick chimera: an experimental system for study of somite development, *Curr. Top. Dev. Biol.* 2000, 48:269–300.
 25. **Plachta N., Bibel M., Tucker K.L., Barde Y.A.,** Developmental potential of defined neural progenitors derived from mouse embryonic stem cells, *Dev.* 2004, 131:5449–5456.
 26. **Kondo T., Johnson S.A., Yoder M.C.,**

- Romand R, Hashino E.**, Sonic hedgehog and retinoic acid synergistically promote sensory fate specification from bone marrow-derived pluripotent stem cells PNAS 2005, 102(13):4789-4794.
27. **Maden M., Sonneveld E., van der Saag P.T., Gale E.**, The distribution of endogenous retinoic acid in the chick embryo: implications for developmental mechanisms. Dev., 1998, 125:4133-4144
28. **Lake J.A., Rathjen J., Remiszewski J., Rathjen P.D.**, Reversible programming of pluripotent cell differentiation, J. Cell Sci. 2000, 113, 555-566.
29. **Rathjen J., Haines B.P., Hudson K.M., Nesci A., Dunn S., Rathjen P.D.**, Directed differentiation of pluripotent cells to neural lineages: homogeneous formation and differentiation of a neurectoderm population, Dev. 2002, 129, 2649-2661.
30. **Li X.J., Wei Du Z., Zarnowska E.D., Pankratz M., Hanen L.O., Pearce R.A., Zhang S.C.**, Specification of motoneurons from human embryonic stem cells, Nat. Biotech., 2005, 1-7.